

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-201470

(43)公開日 平成10年(1998)8月4日

(51)Int.Cl.⁸

識別記号

F I

C 12 N 5/06

C 12 N 5/00

E

審査請求 未請求 請求項の数3 FD (全5頁)

(21)出願番号

特願平9-24517

(71)出願人 000116806

旭メディカル株式会社

東京都千代田区内幸町1丁目1番1号

(22)出願日

平成9年(1997)1月24日

(72)発明者 澄田 政哉

大分県大分市大字里2620番地 旭メディカル株式会社内

(72)発明者 寺嶋 修司

大分県大分市大字里2620番地 旭メディカル株式会社内

(74)代理人 弁理士 佐々木 俊哲

(54)【発明の名称】 細胞分離方法及び細胞浮遊液

(57)【要約】

【課題】 簡便な操作且つ短時間で、必要細胞と不要細胞の混合物から必要細胞を高率に回収する方法と該方法により得られた細胞浮遊液を提供する。

【解決手段】 少なくとも回収必要細胞と除去対象細胞を含む細胞集団を、少なくとも該回収必要細胞を捕捉し、該除去対象細胞は実質的に通過する手段に導入し、次に該手段に $2 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $1000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下の粘度を有する液体を導入して、該手段に捕捉されている該回収必要細胞を該手段より剥離し、該回収必要細胞を回収することを特徴とする細胞分離方法。少なくとも回収必要細胞と除去対象細胞を含む細胞集団を、少なくとも該回収必要細胞を捕捉し、該除去対象細胞は実質的に通過する手段に導入し、次に該手段に $2 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $1000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下の粘度を有する液体を導入して、剥離回収して得られた該回収必要細胞と該液体からなる細胞浮遊液。

捉し、該除去対象細胞は実質的に通過する手段に導入し、次に該手段に $2 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $1000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下の粘度を有する液体を導入して剥離回収して得られた該回収必要細胞と該液体からなる細胞浮遊液である。

【0005】

【作用】本発明の細胞分離方法においては、 $2 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $1000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下という特定の粘度を有する液体を回収液として使用することにより、捕捉手段に捕捉されている必要細胞を高い回収率で、しかも簡単な操作で且つ短時間に剥離回収することができる。更に特定粘度を有する回収液に凍結保存液を用いることにより得られた細胞浮遊液は、そのまま凍結保存ができる。

【0006】

【発明の実施の形態】本発明に用いる捕捉手段としては、捕捉材を容器に充填したものや成型容器で、容器内面に細胞捕捉面が存在するものがあげられる。前記捕捉材としては水不溶性であればいかなる材質でも使用可能であるが、成型性、滅菌性や細胞毒性が低いという点で好ましいものを例示すると、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、アクリル樹脂、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリウレタン等の合成高分子、アガロース、セルロース、酢酸セルロース、キチン、キトサン、アルギン酸塩等の天然高分子、ハイドロキシアパタイト、ガラス、アルミナ、チタニア等の無機材料、ステンレス、チタン等の金属があげられる。また、これらの捕捉材はこのままでも用いることができるが、必要に応じ、アミノ酸、ペプチド、糖タンパク(抗体、接着分子等のバイオリガンドを含む)といった特定の細胞に親和性のあるリガンドを固定してもよい。また、捕捉材の形状としては粒状、纖維塊、織布、不織布、平板、スポンジ状多孔質体等があげられるが、体積あたりの表面積が大きいという点で粒状、纖維塊、織布、不織布が好ましい。また、成型容器で、容器内面に細胞捕捉面が存在するものとしては、フラスコ、ディッシュ、コニカルチューブ、シリング等があげられる。本発明における少なくとも回収必要細胞と除去対象細胞を含む細胞集団の例としては、骨髄、末梢血、臍帯血あるいはこれらを遠心分離器等により粗分離したものがあげられる。また、回収必要細胞と除去対象細胞の組合せの例をいくつか示す。回収必要細胞が白血球であり、除去対象細胞が赤血球、血小板の場合、白血球は捕捉手段に捕捉され、赤血球、血小板は通過し、本発明による特定粘度を有する液体により、捕捉手段に捕捉されている白血球が回収される。また、回収必要細胞がリンパ球であり、除去対象細胞が赤血球、血小板、顆粒球、単球の場合、白血球(顆粒球+単球+リンパ球)は捕捉手段に捕捉され、赤血球、血小板は通過し、本発明による特定粘度を有する液体により捕捉手段に捕捉されている白血球のうちリンパ球のみが回収される。また、回収必要細胞が CD 34 陽性細胞であり、除去対象

細胞が赤血球、血小板、CD 34 陰性細胞である場合、CD 34 陽性細胞は捕捉手段に捕捉され、赤血球、血小板、CD 34 陰性細胞は通過し、本発明による特定粘度を有する液体により捕捉手段に捕捉されているCD 34 陽性細胞が回収される。本発明においては捕捉手段に捕捉されている細胞を特定粘度を有する液体で回収するものであるが、この粘度としては $2 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $1000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下、好ましくは $5 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $500 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下、より好ましくは $10 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以上 $200 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 以下である。粘度が $2 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ 未満では回収率は低く、 $1000 \text{ mPa} \cdot \text{s}$ を超えるとたとえポンプを用いたとしても、通液が著しく困難となり、作業性が劣る。また、圧力の上昇が起こりフィルターとチューブ等の接続部がはずれる可能性もあり危険である。成分としては細胞への悪影響が少ないものが好ましい。いくつか例示するとポリエチレンゴム、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール等の合成高分子溶液、メチルセルロース、ゼラチン、ヒドロキシエチルデンプン、デキストラン、キチン誘導体、コラーゲン、ファイブロネクチン、アルブミン、グロブリン等の天然高分子溶液、グルコース、サッカロース、マルトース、ソルビトール、グリセリン、ジメチルスルホキシド等の有機物溶液及びこれらの混合物があげられる。また、これらを溶かす溶媒としては生理食塩水、D-PBS(ダルベッコリン酸塩緩衝液)、HBSS(ハンクス液)などの緩衝液、 RPMI 1640などの培地があげられる。

【0007】また、本発明による特定の粘度を有する液体はこのまま凍結保存または液状保存に用いられるものであることがより好ましい。即ち、幹細胞の凍結保存を例にあげると、通常、前述の Ficoll 法等により赤血球が分離された細胞集団を洗浄後、凍結保存剤を添加して細胞浮遊液を調製し、これを液体窒素中あるいは冷凍庫内で凍結保存を行うが、本発明においては特定の粘度を有する液体に凍結保存剤を用いることにより、赤血球除去後に煩雑な操作を加えることなく、凍結保存用の細胞浮遊液とすることができる。本発明による特定の粘度を有する液体を捕捉手段に通液する方法としては、ポンプの利用、シリングによる注入、液体を貯留したバッグを押しつぶしで液流を惹起する方法、落差による方法があげられる。また、液体流入口と液体出口が別々の容器からなる捕捉手段の場合は、原料血液の通液方向と同一の方向で回収液を通液するか、逆方向で通液するかに分かれるが、一般的に逆方向の方が回収率が高い傾向がある。更に、単純に通液するだけでなく、捕捉手段に振動を加えたり、ストップドフローにしても良い。また、液体流入口と液体出口が同一の場合、例えばフラスコの場合は、フラスコに本発明による特定の粘度を有する液体をピペット等で導入してから、フラスコ本体を振る、あるいは機械的・超音波振動を加えることで細胞を回収する。

純度、赤血球除去率、血小板除去率はそれぞれ80%、93%、98%、98%であった。なお、本回収液で回収された細胞は前述の凍結保存剤に添付されていたプロトコールにより凍結保存が可能であった。

【0013】

【比較例1】

①細胞分離器の作製

実施例1と同様の細胞分離器を用いた。

②細胞分離操作

3.5%ポリビニルピロリドン水溶液の代わりに生理食塩水を用いる以外は実施例1と同様な操作を行った。なお、本回収液の粘度は1.0 mPa·sであった。本細胞分離操作での白血球回収率、赤血球除去率、血小板除去率はそれぞれ31%、99%、95%であり、白血球*

*回収率が低値であった。

【0014】

【比較例2】

①細胞分離器の作製

実施例5と同様の細胞分離器を用いた。

②細胞分離操作

市販の凍結保存剤にヒト血清アルブミンを添加したもの代わりに生理食塩水を用いる以外は実施例5と同様な操作を行った。なお、本回収液の粘度は1.0 mPa·sであった。本細胞分離操作でのCD34陽性細胞回収率、CD34陽性細胞純度、赤血球除去率、血小板除去率はそれぞれ10%、73%、99%、99%であった。表1に結果のまとめを示す。

表1

	回収液成分	回収液粘度	必要細胞回収率	不要細胞除去率
実施例1	3.5%ポリビニルピロリドン	20.3 mPa·s	白血球75%	赤血球99% 血小板98%
実施例2	40%牛血清アルブミン	17.2 mPa·s	白血球98%	赤血球95% 血小板80%
実施例3	「CP-1」	31.8 mPa·s	白血球75%	赤血球96% 血小板88%
実施例4	牛血清アルブミン添加「6-HES」	17.4 mPa·s	白血球74%	赤血球96% 血小板98%
実施例5	ヒト血清アルブミン添加「CP-1」	19.0 mPa·s	CD34陽性細胞80%	赤血球98% 血小板98%
比較例1	生理食塩水	1.0 mPa·s	白血球31%	赤血球99% 血小板95%
比較例2	生理食塩水	1.0 mPa·s	CD34陽性細胞10%	赤血球99% 血小板99%

【0015】

【発明の効果】以上示したように、本発明による細胞分離方法は簡便な操作且つ短時間で、必要細胞と不要細胞の混合物から必要細胞を高率に回収することができ、ま

た得られた細胞浮遊液はその後の煩雑な細胞浮遊液調製操作を経ることなく凍結保存が可能なので、造血幹細胞移植分野や養子免疫療法分野の細胞処理工程における省力化に貢献するところ大である。